

METHOD OF PROTECTING SINGLE-PHASE DISTRIBUTION LINE FROM LIGHTNING DAMAGE

Publication number: JP2004266900

Publication date: 2004-09-24

Inventor: SUGIMOTO HITOSHI; ASAOKA YOSHINOBU;
NAKADA KAZUO

Applicant: HOKURIKU ELECTRIC POWER

Classification:

- international: H02H9/06; H02G7/00; H02G13/00; H02H9/06;
H02G7/00; H02G13/00; (IPC1-7): H02H9/06; H02G7/00;
H02G13/00

- European:

Application number: JP20030052785 20030228

Priority number(s): JP20030052785 20030228

Report a data error here

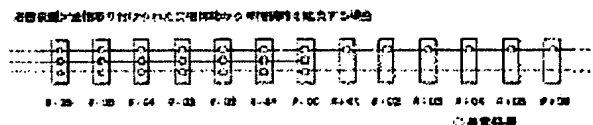
Abstract of JP2004266900

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method of protecting a single-phase distribution line from thunder, which enables omission of attaching a lightning protector, while maintaining low thunder short-circuit damage rate.

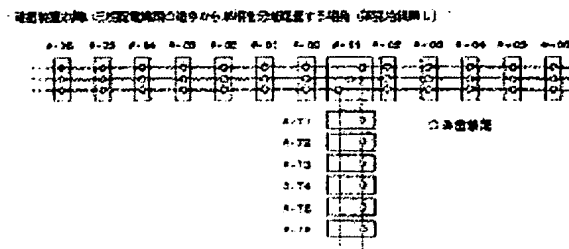
SOLUTION: This method omits attachment of lightning protectors to only one phase provided for all utility poles, in the single-phase distribution line which is constituted by drawing out two phases from a three-phase distribution line, where lightning protectors are attached to all phases as regards all utility poles.

COPYRIGHT: (C)2004,JPO&NCIPI

(イ)



(ロ)



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-266900

(43) 公開日 平成4年(1992)9月22日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 15/08		7731-4H		
A 6 1 K 37/02	A D Z	8314-4C		
C 0 7 K 3/02				
7/08	Z N A	8318-4H		
		8828-4B		
			C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数8(全 9 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-49261

(22) 出願日 平成3年(1991)2月21日

(71) 出願人 000216162

天野製薬株式会社

愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号

(72) 発明者 名取 俊二

茨城県北相馬郡利根町布川2208-19

(54) 【発明の名称】 新規生理活性蛋白、その製造法および用途

(57) 【要約】

【目的】 センチクバエ幼虫の体液中に存在する新規生理活性蛋白を提供する。本発明の新規生理活性蛋白は真菌類に対して強い抗菌作用を有する。

【構成】 センチクバエ幼虫体液中に存在する新規な生理活性蛋白は、11種類のアミノ酸よりなる蛋白であり、グリシンとヒスチジンがモル比でそれぞれ30%及び20%を占める偏ったアミノ酸組成を持つ。この蛋白とザルコトキシニンI及び/又はザーペシンと併用することによって抗真菌作用が著しく増大する。本発明はこの蛋白及びその製造法さらにはそれを用いた抗真菌剤に関する。

Applicants: Peter David East and Susan
Elizabeth Brown
U.S. Serial No.: 10/590,539
Filed: as §371 national stage of
PCT/AU2005/000234
Exhibit 26

1

2

【特許請求の範囲】

* (1) 分子量約13,000

【請求項1】 双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫

(2) 熱安定性(5~10分間、100℃)

体液中に存在し、下記の性質を有する生理活性蛋白。 *

(3) アミノ酸組成(モル%)

グリシン	約 30.93
ヒスチジン	約 20.05
グルタミン酸またはグルタミン	約 17.51
アスパラギン酸またはアスパラギン	約 10.75
チロシン	約 7.13
アラニン	約 3.49
バリン	約 3.01
リジン	約 2.92
ロイシン	約 1.55
アルギニン	約 1.44
セリン	約 1.23

【請求項2】 配列表の配列番号:1に記載するアミノ

※とを特徴とする生理活性蛋白の製造法。

酸配列で示される生理活性蛋白。

(1) 分子量約13,000

【請求項3】 双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫

(2) 熱安定性(5~10分間、100℃)

体液より下記の性質を有する生理活性蛋白を取得するこ※

(3) アミノ酸組成(モル%)

グリシン	約 30.93
ヒスチジン	約 20.05
グルタミン酸またはグルタミン	約 17.51
アスパラギン酸またはアスパラギン	約 10.75
チロシン	約 7.13
アラニン	約 3.49
バリン	約 3.01
リジン	約 2.92
ロイシン	約 1.55
アルギニン	約 1.44
セリン	約 1.23

【請求項4】 双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫

30★体液中に存在し、下記の性質を有する生理活性蛋白を含有してなる抗真菌剤。

体液より配列表の配列番号:1に記載するアミノ酸配列で示される生理活性蛋白を取得することを特徴とする生理活性蛋白の製造法。

(1) 分子量約13,000

(2) 熱安定性(5~10分間、100℃)

【請求項5】 双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫★

(3) アミノ酸組成(モル%)

グリシン	約 30.93
ヒスチジン	約 20.05
グルタミン酸またはグルタミン	約 17.51
アスパラギン酸またはアスパラギン	約 10.75
チロシン	約 7.13
アラニン	約 3.49
バリン	約 3.01
リジン	約 2.92
ロイシン	約 1.55
アルギニン	約 1.44
セリン	約 1.23

【請求項6】 配列表の配列番号:1に記載したアミノ酸配列で示される生理活性蛋白を含有してなる抗真菌剤。

にザルコトキシンおよび/又はザーベシンを含有してなる抗真菌剤。

(1) 分子量約13,000

【請求項7】 双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫

(2) 熱安定性(5~10分間、100℃)

体液中に存在し、下記の性質を有する生理活性蛋白並び

50 (3) アミノ酸組成(モル%)

3	4
グリシン	約 30.93
ヒスチジン	約 20.05
グルタミン酸またはグルタミン	約 17.51
アスパラギン酸またはアスパラギン	約 10.75
チロシン	約 7.13
アラニン	約 3.49
バリン	約 3.01
リジン	約 2.92
ロイシン	約 1.55
アルギニン	約 1.44
セリン	約 1.23

【請求項8】 配列表の配列番号：1に記載したアミノ酸配列で示される生理活性蛋白並びにザルコトキシンおよび／又はザーペシンを含有してなる抗真菌剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫体液中に存在する新規な生理活性蛋白およびその製造法ならびにその用途に関する。

【0002】

【従来の技術】細菌や異種の血球を、昆虫に接種したり単に体表に傷をつけるといった刺激を与えると体液中に数々の蛋白が誘導されることが知られている。これらの物質は、抗体産生能を持たない動物の生体防御にとって重要な係わりがあるものと考えられる。これらのうちで例えばセンチニクバエ (*Sarcophaga peregrina*) 幼虫体液中に誘導される活性蛋白として、血球凝集作用をもつ蛋白 [J. Biol. Chem., 255巻、2919-2924頁 (1980)]、抗菌活性を持つ蛋白 [Biochem. J., 211巻、727-734頁 (1983)] などが同定されている。

【0003】前者のレクチン様蛋白は、ザルコファルガ (*Sarcophaga*) レクチンと命名され、マウスの骨髄細胞やマクロファージの真菌殺能を増強させる、ヒトT細胞よりのインターフェロンの産生を導く、生体防御等の作用が研究されている。

【0004】また後者の本発明者が分離精製した抗菌活性を持つ蛋白としては、ザルコトキシン (*Sarcotoxin*) I と命名され、その理化学的性質も明らかにされている (特開昭59-13730) 蛋白、ザルコトキシン II と命名され、その理化学的性質も明らかにされている (特開昭63-35599) 蛋白、および同じくセンチニクバエの幼虫体液から得られ、ザーペシン (*Sapecin*) と命名され、その理化学的性質も明らかにされている (特開昭63-185997) 蛋白等が知られている。これらは幅広い抗菌スペクトルを有することから、生体防御物質と考えられ、更にこれらの抗菌性蛋白は特にグラム陰性菌の大腸菌及びグラム陽性菌の黄色ブドウ球菌に対して強い抗菌力を有している。

【0005】一方、近年高等哺乳動物でも、精液中や血清中に、抗菌力が強く幅広いスペクトルを持つ抗菌性蛋白の存在が明かとなり、一般に動物体液中の抗菌性蛋白が重要視されている。

【0006】センチニクバエの抗菌性蛋白であるザルコトキシン I については、本発明者らはザルコトキシン I A、I B および I C と命名した三つの物質を既に精製しており、これらは互いに2~3アミノ酸残基のみが異なる、いずれも39アミノ酸残基からなることを示した [J. Biol. Chem., 260巻、7174-7177頁 (1985)]。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、従来得られている抗菌性蛋白 (ザルコトキシン I、II 或いはザーペシン) は大腸菌及びその近縁のバクテリアに対して強い抗菌力を示すが真菌類に対してはその作用が認められていない。

【0008】よって、本発明者はセンチニクバエの他の抗菌性蛋白について精製・分離方法を確立し、物質の性状、アミノ酸配列等の理化学的性状を明らかにした。従って、この蛋白性物質が単一なまでに精製・分離でき、そのアミノ酸配列が決定され、さらにこれら昆虫由来の蛋白がヒトなどの脊椎動物の生体防御機構に働くとなれば、例えば医学・薬学的見地からも寄与するところは大い。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、双翅目または膜翅目に属する昆虫、とりわけセンチニクバエ幼虫のの体液中に誘導される生理活性蛋白である、既に構造決定された蛋白類 (前記) とは別の、誘導されることなく幼虫体液中に存在している蛋白類について、その精製・分離に成功したことに基づくものである。つまり、本発明による新規な生理活性蛋白は真菌類に対して抗菌作用を有する新規な抗真菌性蛋白およびその製造法並びにその利用方法に関する。

【0010】本発明による抗真菌性蛋白は、双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫体液中に存在し、下記の性質を有する生理活性蛋白である。

(1) 分子量約13,000

5

(2) 熱安定性 (5~10分間、100℃)

グリシン
 ヒスチジン
 グルタミン酸またはグルタミン
 アスパラギン酸またはアスパラギン
 チロシン
 アラニン
 バリン
 リジン
 ロイシン
 アルギニン
 セリン

6

(3) アミノ酸組成 (モル%)

約 30.93
 約 20.05
 約 17.51
 約 10.75
 約 7.13
 約 3.49
 約 3.01
 約 2.92
 約 1.55
 約 1.44
 約 1.23

【0011】また、本発明による生理活性蛋白の製造法は、双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫体液より体液細胞および脂肪体を除去したものから上記の性質を有する生理活性蛋白を取得することを特徴とするものである。

【0012】さらにまた、本発明による抗真菌剤は、双翅目または膜翅目に属する昆虫の幼虫体液中に存在し、上記の性質を有する生理活性蛋白を有効成分とするものであり、また、センチニクバエより既に単離精製されているザルコトキシシンI及び/又はザーベシンを上記の生理活性蛋白と併用することにより抗真菌活性が増強された抗真菌剤である。

【0013】また、上記の生理活性蛋白は単離精製され、そのアミノ酸配列が決定されている。その配列は配列表の配列番号：1に示される。以下に本発明をより具体的に説明する。

【0014】(A) 対象昆虫および体液の取得
 本発明で対象とする昆虫は、双翅目または膜翅目に属する昆虫である。具体的には、ハエ、カ、ハチ、アブなどである。これらのうちでは、ニクバエ科のハエ、特にセンチニクバエが好ましい。

【0015】対象昆虫は、幼虫でなければならない。ここで「幼虫」とは、昆虫の完全変態の過程において、蛹化後、蛹化前のものをいう。本発明で適当なものは、三令に同調してある幼虫、特にセンチニクバエ幼虫である。

【0016】生理活性蛋白を得るには、体液をしぼり出し、遠心分離により体液細胞を除き、さらに得られた上清から脂肪体および不要な蛋白を除くため温浴中で加熱(例えば100℃、10分)後、遠心上清をとり、出発材料とする。

【0017】(B) 抗真菌性ポリペプチドの精製・分離
 一般の高分子蛋白類の分画と精製に常用されるさまざまな方法が適用できる。本発明において、特にセンチニクバエ幼虫を用いる場合、上記で得られた遠心上清を逆相HPLCで分画し、各分画について後に述べる抗真菌活性の測定法に従って有意な活性を示す画分を分取し、更に逆相HPLCを繰り返し単一のピークにまで精製でき

る。

【0018】該遠心画分から本発明の単一な物質まで精製する場合、上記以外にもさまざまな方法が考えられ、例えばイオン交換樹脂処理、吸着クロマトグラフィー、電気泳動などを適宜用いて目的を達することが可能である。

【0019】このようにして得られた抗真菌性物質はトリプシン処理によって失活することから蛋白性物質であることは明らかである。

【0020】本発明による抗真菌性蛋白の抗真菌活性の測定法は、真菌類例えばキャンディダ(Candida)属に属する微生物を用いて、そのコロニー形成数を指標にして測定できる。

【0021】また前述のように、このバンドの物質が例えばトリプシン処理によって失活することにより、蛋白性物質であることも確認できる。この抗真菌性蛋白は、凍結乾燥を行うと白色粉末として得られる。

【0022】(C) 用途
 本発明により抗真菌性蛋白は、その抗真菌性を生かして抗真菌剤として有用である。すなわち、それ単独で、あるいは適当な液体、固体または気体の担体ないし希釈剤と組み合わせた形態で、外用或いは内用の抗真菌剤として使用することができる。また、本発明の生理活性蛋白はザルコトキシシンIおよび/又はザーベシンと併用することによって、その抗真菌活性が著しく増大する。

【0023】特にザルコトキシシンIの効果は顕著である。ザルコトキシシンとは前記に述べたようにセンチニクバエ由来の抗菌性蛋白であり、本発明者らがザルコトキシシンIA、IBおよびICと命名した三つの物質のいずれであってもよく、もちろんこれらの混合物であっても良い。

【0024】これらの添加量としては本発明の生理活性蛋白の抗真菌作用を増強させる効果をもたらす量で有れば良く通常本発明の生理活性蛋白に対して0.1%~10%で有れば良い。もちろん他の抗菌剤等を添加混合しても良い。

【0025】従って、本発明の抗真菌性蛋白は、例えば、細菌性疾患に対する薬剤として使用することができ

7

る。その場合は、投与の剤型およびその投与量については、患者および疾患の種類、症状などを勘案して、本発明による抗真菌効果が認められる限り任意の選択が可能である。

【0026】本発明の抗真菌性蛋白は蛋白質そのものであるところ、その毒性は少なくとも結果的に経口にて接種されるときには、ほとんどないと考えられる。従って、この抗菌性ポリペプチドは、ヒトおよび動物用の薬剤および食品ないし飼料添加物として利用することができる。例えば、本発明による抗真菌性蛋白は食品添加物としての抗真菌剤、換言すれば可食性抗真菌剤として有用である。

【0027】以下、実施例を記載しながら本発明を詳述する。

【実施例】(1) 出発材料

センチニクバエ幼虫は、室温中水でぬらしておき、5日以上絶食した三令幼虫を用いた。

【0028】幼虫頭部を切断し、氷上、ペトリ皿中にしみ出した体液滴を採取した。通常体液1mlは約100匹の幼虫から得られた。得られた体液を200×Gで5分間の遠心分離に付して血球成分を除き、澄明な上清を-20℃で保存した。

【0029】(2) 体液の遠心上清

約10000匹の幼虫から採取した体液(40~50ml)を緩衝液A(10mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH6.0)で5倍に希釈した。その後、100℃で10分間加熱処理後、40,000×g/10分間の遠心分離に付して変性蛋白質を除去し、得られた上清をメンブランフィルター(UF disc type A, Spectrum)を用いた限外ろ過で濃縮した。

【0030】(3) 抗真菌活性の測定

検定菌としてキャンディダ・アルビカンス(Candida albicans) ATCC36232を使用した。検定菌を1×10⁵ cells/mlとなるように水に懸濁し、その90μlに被検液10μlを混合して37℃で24時間放置する。その後この液10μlをサブロー寒天培地を用いて37℃で一昼夜培養し、コロニー数を計測する。

【0031】(4) 逆相HPLCによる画分・精製

(2)で得られた遠心画分をギルソンのシステムにつないだ逆相カラム(シンクロパック(Synchrompak) RP-P, C-18 250×4.1mm)の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に流した。そし

8

て、0.05%トリフルオロ酢酸を含んだアセトニトリルの濃度勾配により、吸着画分を溶出させた。各画分は凍結乾燥した後に緩衝液にとかし、(3)に従ってその抗真菌活性を測定した。活性が認められた画分につき更にHPLCを繰り返した。

【0032】得られた画分の凍結乾燥の一部を、2%(v/v)β-メルカプロエタノール含有1%(w/v)SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)溶液に溶解し、100℃、5分間加熱処理後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。ゲルのアクリルアミド含量は12.5%であった。泳動後、ゲルをクマシブリリアントブルーR-250で染色したところ、分子量約13,000の単一蛋白バンドを与えた。

【0033】指標タンパクとしてはオバルブミン(45,000)、α-キモトリプシノーゲン(25,000)、リゾチーム(14,000)およびチトクロムC(12,000)を用いた。

【0034】蛋白量はローリーの方法[J. Biochem., 193巻、265頁(1951)]を修正して行った。即ち、適当量の試料(5~20μg)に緩衝液(緩衝液Aに130mMのNaClを含有)を加え、最終的に緩衝液の半量の塩濃度にし、その200μlに対して10%トリクロロ酢酸200μlを加え、70℃で20分間加熱したのち、氷中に30分間以上放置する。

【0035】3000rpm(15分間、4℃)の遠心により沈殿をとり、ローリー法用の溶液C200μlおよび蒸留水200μlを加え、10分間室温放置後、フェノール試薬20μlを加え、37℃で40分間加熱後、700nmの吸光度を測定した。スタンダードとして牛血清アルブミンを用いた。

【0036】(5) アミノ酸組成の測定

得られた抗真菌性蛋白のアミノ酸組成を日立835型アミノ酸分析計、高分離法によって分析した。表1に示すように、11種類のアミノ酸よりなる蛋白であり、グリシンとヒスチジンがモル比でそれぞれ30%及び20%を占める偏ったアミノ酸組成を持つことが判った。なお、ここでアミノ酸残基数は、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動での主要蛋白の分子量を基準に計算した。

【0037】

【表1】

アミノ酸	モル (%)	アミノ酸残基数
グリシン	30.93	21
ヒスチジン	20.05	14
グルタミン酸+グルタミン	17.51	11
アスパラギン酸+アスパラギン	10.75	7
チロシン	7.13	5
アラニン	3.49	2
バリン	3.01	2
リジン	2.92	2
ロイシン	1.56	1
アルギニン	1.44	1
セリン	1.23	1
計	100.0	67

【0038】(6) アミノ酸配列の推定

センチニクバエ幼虫(100匹)の組織をグアニジニウムチオシアネートにより処理して全RNA(10mg)を抽出し、0.5M-NaClを含有する10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)を結合緩衝液としてオリゴdTセルロースに結合させ、次にNaClを含有しない緩衝液で溶出させることによりpoly(A) RNAを200μg得た。

【0039】Okayama-Bergの方法[*Mol. Cell. Biol.*、2巻、161-170頁(1982)]に従って約30μgの上記poly(A) RNAと3μgのベクタプライマDNAとを用いてcDNAを作成し、モリソン等の方法[*Method in Enzymol.*、68巻、326-331頁(1979)]に従って大腸菌(HB101株)の形質転換を行った。

【0040】50μg/mlのアンピシリンを含有するLB-寒天培地を用いて形質転換細胞をスクリーニングしたところアンピシリン耐性を示す形質転換細胞が約5万個得られた。

【0041】(4)で精製された本発明の生理活性蛋白をパイログルタメイト・アミノペプチダーゼ処理した後、エドマン分解し、PTH-アミノ酸を分析したところ、N末端のアミノ酸配列(配列番号:2)20個が決定された。また、本発明の生理活性蛋白をTPCKトリプシンで限定分解して得られた断片のアミノ酸配列(配列番号:4)を決定した。

【0042】決定されたアミノ酸配列(配列番号:2及び配列番号:4)に相当するmRNAと相補的な配列(配列番号:3及び配列番号:5)に示されるイノシンを含む20個及び23個のデオキシリボヌクレオチドからなる32種及び16種のオリゴデオキシリボヌクレオチドを合成した。これらの合成にはβ-シアノエチルフォスファアミダイド法[*Nucleic Acid Research*、16巻、257-260頁(195

4)]に従ってファルマシア社製のDNA合成装置を用いて行った。

【0043】クローニングは[Gene、10巻、63-67頁(1980)]の方法に従った。すなわち、上記で得られたアンピシリン耐性を示す形質転換株をニトロセルロース膜にレプリカし、50μg/mlのアンピシリンを含有する寒天プレート上で3-4時間培養した後、更に500μg/mlのクロラムフェニコールを含有するLB-寒天培地に移し、37℃で一昼夜培養した。フィルター上に生じたコロニーを0.5N-水酸化ナトリウムで溶菌し、二本鎖DNAを一本鎖DNAとした。

【0044】次いで中和してpH7.5とする。次いで1.5M-NaClを含有するトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に上記のフィルターを5分間浸漬して菌体の残渣を除いた。その後、フィルターを乾燥し、80℃で2時間ベーキングし、プレートに固定してスクリーニング用の被検フィルターとした。

【0045】形質転換株のスクリーニングはグルテンシュタイン等の方法[*Proc. Natl. Sci. USA*、72巻、3961-3965頁(1975)]に従った。即ち、配列番号:3及び配列番号:5の各オリゴデオキシリボヌクレオチドの5'末端に[γ-³²P]ATPを用いポリヌクレオチドキナーゼでラベルしてスクリーニング用のプローブとした。

【0046】上記の被検フィルター上の形質転換株を配列番号:3で示される群の標識オリゴデオキシリボヌクレオチドをプローブとして50℃でのハイブリダイゼーションによりスクリーニングし、配列番号:5で示される群の標識オリゴデオキシリボヌクレオチドをプローブとして50℃でのハイブリダイゼーションによるスクリーニングしたところ、両群のオリゴデオキシリボヌクレオチドにハイブリダイズする形質転換株20株を得た。

【0047】生理活性蛋白をコードするcDNAの塩基配列の決定は生理活性蛋白クローンを制限酵素により切

断した断片をM13ファージベクターを用いたダイデオキシ法〔Anal. Biochem.、152巻、232-238頁(1986)〕に従ってサブクローニングして行った。

【0048】配列番号：6に、このようにして決定された生理活性蛋白含有クローンの塩基配列(cDNAと相補的配列)及び生理活性蛋白の塩基配列にから推定されるアミノ酸配列を示す。(4)で得られた精製された生理活性蛋白のN末端の配列より67個のアミノ酸残基数と(5)で計算したアミノ酸残基数とよく一致している。

【0049】(7)抗真菌性蛋白濃度と抗真菌活性の測定

(2)で得られた精製された抗真菌性蛋白を用いて測定した。なお、(3)の抗真菌活性の測定において被検液10 μ l中の蛋白量を0~100 μ g/mlと変化させて測定した。その結果を図1に示す。この結果より、本発明の生理活性蛋白の抗真菌活性は真菌細胞を蒸留水中で処理することによって強く認められた。

*

実験 番号	抗真菌性蛋白の添加の有無			コロニー 形成数 (個)
	本発明の生 理活性蛋白	サルコ トキシ	ザーベシ	
1	—	—	—	3400 \pm 50
2	○	—	—	2850 \pm 150
3	○	○	—	800 \pm 10
4	○	—	○	2750 \pm 10
5	○	○	○	500 \pm 100
6	—	○	○	3900 \pm 100
7	—	○	—	3900 \pm 200
8	—	—	○	4050 \pm 50

【0053】表2及び図2より本発明の抗真菌性蛋白の抗真菌力はザルコトキシンの存在下で著しく活性化され、ザーベシンの存在下でも僅かであるが活性化されることが判った。なお、ザルコトキシN及びザーベシンの単独使用或いはこれらの混合物を用いたときには抗真菌作用はみられなかった。

【0054】以上の結果よりセンチニクバエは、単独では抗真菌作用を示さない抗細菌性蛋白と本発明の生理活性蛋白を組み合わせることによって効率的な真菌防御機構を構築しているものと考えられる。

【0055】

【発明の効果】本発明による抗真菌性蛋白はそれ自体抗※

Gln His Gly His Gly Gly Gln Asp Gln His Gly Tyr Gly His Gly 15
Gln Gln Ala Val Tyr Gly Lys Gly His Glu Gly His Gly Val Asn 30
Asn Leu Gly Gln Asp Gly His Gly Gln His Gly Tyr Ala His Gly 45
His Ser Asp Gln His Gly His Gly Gly Gln His Gly Gln His Asp 60
Gly Tyr Lys Asn Arg Gly Tyr 67

【0057】配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

*【0050】(8)抗真菌性蛋白とその他の抗細菌性蛋白との相乗効果

本発明の抗真菌性蛋白と同じくセンチニクバエ体液より既に単離精製されているサルコトキシNおよびザーベシンの存在下での抗真菌活性を測定した。

【0051】(3)と同様に検定菌としてはキャンディダ・アルビカンス(*Candida albicans*) ATCC36232を使用した。検定菌を1.1 \times 10⁵ cells/mlとなるようにサブローブロスに懸濁し、その90 μ lにザルコトキシN(10 μ g/ml)或いはザーベシン(10 μ g/ml)及び本発明の抗真菌性蛋白を各種組み合わせで添加混合して37℃で2時間及び6時間放置する(最終液量は102.25 μ l)。その後、この液10 μ lをサブロー寒天培地を用いて37℃で一昼夜培養し、コロニー数を計測する。この結果を表2及び図2に示す。

【0052】

【表2】

※菌性を有し、しかも毒性はほとんどない。従ってこの性質を利用できる種々の用途が考えられるが、特にこれらの物質を有効成分とする医薬品製剤としての応用、あるいは食品添加物としての利用が期待できる。

【配列表】

【0056】配列番号：1

配列の長さ：67

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

13	14
配列の種類：ペプチド	配列
His Gly His Gly Gly Gln Asp Gln His Gly Tyr Gly His Gly Gln	15
Gln Ala Val Tyr Gly	20
【0058】配列番号：3	* トポロジー：直鎖状
配列の長さ：20	配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列の型：核酸	配列
	*
A A T A T	
CC TA ICC T G TG TC TG	20
G G C G C	
【0059】配列番号：4	※ トポロジー：直鎖状
配列の長さ：15	配列の種類：ペプチド
配列の型：アミノ酸	※ 配列
Gly His Glu Gly His Gly Val Asn Asn Leu Gly Gln Asp Gly His	15
【0060】配列番号：5	★ トポロジー：直鎖状
配列の長さ：23	配列の種類：他の核酸 合成DNA
配列の型：核酸	★ 配列
A A T A	
TT TT IAC IC C TG ICC TC TG	23
G G C G	
【0061】配列番号：6	☆ 鎖の数：二本鎖
配列の長さ：313	トポロジー：直鎖状
配列の型：核酸	配列の種類：Genomic DNA
	☆ 配列
AATTTTAAAA AGACACAAA ATG GTT AAA TTA TTC GTC ATT GTT ATT	46
Met Val Lys Leu Phe Val Ile Val Ile	
-15 -10	
TTG GCA CTA ATT GCA GTT GCC TTT GGG CAA CAT GGT CAC GGA GGT	91
Leu Ala Leu Ile Ala Val Ala Phe Gly Gln His Gly His Gly Gly	
-5 1 5	
CAG GAT CAG CAT GGT TAT GGA CAT GGT CAA CAG GCC GTT TAC GGT	136
Gln Asp Gln His Gly Tyr Gly His Gly Gln Gln Ala Val Tyr Gly	
10 15 20	
AAA GGT CAT GAA GGA CAT GGT GTT AAC AAC TTA GGT CAG GAT GGC	181
Lys Gly His Glu Gly His Gly Val Asn Asn Leu Gly Gln Asp Gly	
25 30 35	
CAT GGT CAG CAT GGC TAT GCC CAC GGT CAT AGC GAT CAA CAT GGT	226
His Gly Gln His Gly Tyr Ala His Gly His Ser Asp Gln His Gly	
40 45 50	
CAT GGT GGT CAA CAT GGA CAA CAT GAT GGC TAT AAA AAC CGT GGT	271
His Gly Gly His His Gly Gln His Asp Gly Tyr Lys Asn Arg Gly	
55 60 65	
TAT TAGAAAATCA ATTAGATTTT GATTTAAGAAA TTAAATTT	313
Tyr	
67	

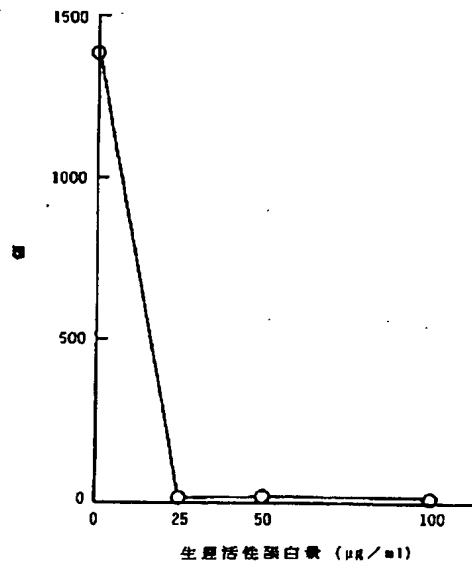
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の生理活性蛋白の抗真菌作用を示す。

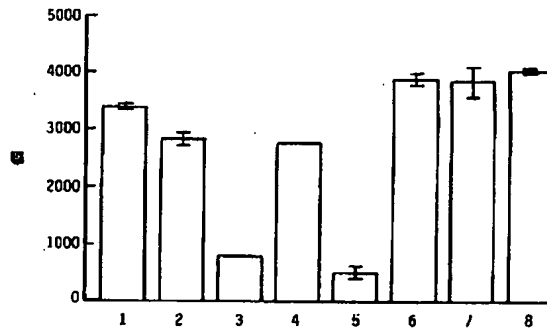
【図2】本発明の生理活性蛋白とザルコトキシニンI およ

び／又はザーベシンを併用したときの抗真菌活性の比較
(表2)の結果を表す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

C 0 7 K 7/10

// C 1 2 N 15/12

C 0 7 K 99:00

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

8318-4H